



**Marta Isabel Rodrigues Nobre**

Licenciatura em Engenharia Biomédica

**Caracterização espectroscópica de acetona como  
marcador em pacientes diabéticos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: Professor Doutor Paulo Manuel Assis Loureiro  
Limão-Vieira, Professor Associado com Agregação, Faculdade  
de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca  
Arguente: Prof. Doutora Maria Luísa Dias de Carvalho de Sousa Leonardo  
Vogal: Prof. Doutor Paulo Manuel Assis Loureiro Limão Vieira



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Novembro 2013**



## **Caracterização espectroscópica de acetona como marcador em pacientes diabéticos**

“Copyright” em nome de Marta Isabel Rodrigues Nobre, estudante do curso de Engenharia Biomédica, da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## **Agradecimentos**

Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Paulo Limão-Vieira por ter-me dado a possibilidade de realizar a dissertação de mestrado sob sua orientação, e ainda pelo exemplo de dedicação demonstrado, dando uma inestimável ajuda na realização deste trabalho, disponibilizando todo o tempo necessário para me ajudar.

Ao CEFITEC pelas condições de trabalho proporcionadas.

Aos meus colegas de curso, pelo carinho e amizade.

Aos meus pais e irmã, pelo apoio incondicional, pela confiança, dedicação, optimismo e oportunidades que me proporcionaram ao longo da vida pessoal, académica, e profissional.

A todas as pessoas que não foram mencionadas, mas que influenciaram todo o meu percurso, com paciência, amizade e companheirismo.

## Resumo

Neste trabalho identificou-se e caracterizou-se, espectroscopicamente a acetona como constituinte e marcador específico do ar exalado por pacientes diabéticos. Identificaram-se, outras técnicas de caracterização e detecção de compostos exalados, bem como a sua correspondência com outro tipo de patologias. Estabeleceram-se algumas limitações entre as técnicas disponíveis no mercado. A existência de testes de respiração como uma forma de diagnosticar doenças está presente desde o início da história da medicina. Há aproximadamente 3000 compostos orgânicos voláteis (VOCs) que foram detectados, pelo menos, uma vez na respiração humana, e a maioria das amostras de respiração normalmente contém mais de 200 VOCs. Muitos destes compostos foram identificados sendo que o ar exalado pode conter vestígios de compostos orgânicos voláteis, como metanol, acetona ou isopreno e mesmo pequenas moléculas inorgânicas como o óxido nítrico, o monóxido de carbono ou de sulfureto de carbonilo. Como as pessoas diabéticas não-tratadas produzem grande quantidade de acetoacetato, o seu sangue contém quantidades significativas de acetona. A acetona é volátil e confere um odor característico ao ar exalado, o que, às vezes, é útil no diagnóstico da severidade da doença. Neste trabalho apresenta-se a espectroscopia de ultra violeta do vácuo (UVV) por radiação sincrotrão numa gama de energia (3,0 – 10,8 eV), para determinação de limites de detecção de acetona para ser utilizada em técnicas de monitorização de pacientes com patologia diabética.

Palavras Chave: acetona, compostos orgânicos voláteis (VOCs), diabetes

## **Abstract**

In this thesis we have identified and characterised the acetone electronic state spectroscopy as a marker in exhaled breath of patients with diabetes. Other tracing techniques are discussed and referred within the context of particular illnesses and their limitations evaluated. Exhaled breath technique has been reported since the early stages of medicine. The human breath contains around 3000 volatile organic compounds (VOCs) and in the major cases of exhaled air at least 200 VOCs are always present. From these compounds the most common traces include methanol, acetone or isoprene and also other inorganic containing molecules such as nitric oxide, carbon monoxide or carbonyl sulphide. Patients with no treated diabetes show high levels of acetoacetate and ketone bodies (including acetone) in their blood stream. Acetone is a volatile compound with a characteristic odour and when exhaled can be recognized as a trace gas related to diabetes. In this work we present the vacuum ultraviolet (VUV) spectroscopy of acetone by synchrotron radiation in the energy range 3.0 – 10.8 eV. This energy region is here used to trace acetone in monitoring processes of patients with diabetes.

Keywords: acetone, volatile organic compounds (VOCs), diabetes

## Índice de Matérias

|   |     |
|---|-----|
| Agradecimentos .....  | iv  |
| Resumo .....  | v   |
| Abstract .....  | vi  |
| Índice de Matérias .....  | vii |
| Índice de Ilustrações .....   | ix  |
| Índice de Tabelas .....   | x   |
| Simbologia e notações.....  | xi  |
| 1 Enquadramento Histórico.....  | 1   |
| 1.1 Breve Historia da relevância da Insulina no contexto da diabetes..... | 1   |
| 1.2 Breve Historia da Diabetes Mellitus .....                             | 2   |
| 1.2.1 O que é a diabetes? .....   | 3   |
| 1.2.2 O que é a diabetes tipo 2?.....                                     | 4   |
| 1.2.3 O que é a diabetes tipo 1?.....                                     | 4   |
| 1.2.4 Outros tipos de diabetes.....                                       | 4   |
| 2 Relevância do ar exalado por humanos .....                              | 6   |
| 2.1 Utilização como biomarcadores de doenças.....                         | 6   |
| 2.2 Concentrações em ar exalado .....                                     | 8   |
| 2.3 Exemplos de biomarcadores voláteis.....                               | 9   |
| 2.3.1 Acetona .....   | 10  |
| 2.3.2 Isopreno .....  | 14  |
| 3 Medição de compostos orgânicos voláteis na respiração humana .....      | 15  |
| 4 Dispositivo experimental .....  | 20  |
| 4.1 Introdução .....  | 20  |
| 4.2 Radiação Sincrotrão .....   | 20  |
| 4.2.1 ASTRID radiação sincrotrão, Dinamarca .....                         | 20  |
| 4.2.2 Monocromador UV1.....   | 24  |

|       |  |                                     |
|-------|--|-------------------------------------|
| 4.2.3 | UV1 câmara de foto - absorção .....                            | 25                                  |
| 4.2.4 | A análise de dados .....                                       | 27                                  |
| 5     | Discussão e Resultados.....                                    | 29                                  |
| 5.1   | Região 7,5 – 8,5 eV .....                                      | 32                                  |
| 5.2   | Região 6,0 – 7,0 eV .....                                      | 32                                  |
| 5.3   | Região 4,0 – 5,5 eV .....                                      | 32                                  |
| 6     | Comparação dos limites de detecção dos níveis de acetona ..... | 34                                  |
| 7     | Conclusões .....   | 36                                  |
| 8     | Trabalho futuro .....  | 38                                  |
|       | Referencias .....  | 39                                  |
|       | Anexos .....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |



## Índice de Ilustrações

|  |    |
|--|----|
| Ilustração 1. Acetil-CoA (acetilcoenzima A) .....  | 10 |
| Ilustração 2. Acetoacetato .....   | 11 |
| Ilustração 3. D-β-hidroxibutirato .....  | 11 |
| Ilustração 4. Acetona .....  | 11 |
| Ilustração 5. Esquema de formação dos corpos cetónicos .....   | 12 |
| Ilustração 6. Estrutura do Isopreno .....  | 14 |
| Ilustração 7. Gradientes alveolares dos VOCs mais abundantes na respiração.....                        | 16 |
| Ilustração 8. Fontes de VOCs na respiração alveolar. ....  | 17 |
| Ilustração 9. Representação esquemática do acelerador Sincrotrão.....                                  | 21 |
| Ilustração 10. Diagrama esquemático de radiação Sincrotrão. ....                                       | 22 |
| Ilustração 11. Linha do de feixe de luz UV1. ....  | 23 |
| Ilustração 12. Diagrama esquemático da linha de Luz UV1. ....  | 24 |
| Ilustração 13. A célula foto-absorção. ....  | 25 |
| Ilustração 14. O espectro de foto-absorção de O <sub>2</sub> e SO <sub>2</sub> . ....                  | 27 |
| Ilustração 15. Espectro de foto-absorção de elevada resolução da acetona por radiação sincrotrão. .... | 30 |

## Índice de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Alguns exemplos de marcadores de doenças. ....    | 8  |
| Tabela 2. Os compostos voláteis de origem fisiológica ..... | 10 |
| Tabela 3. Especificações ópticas da linha UV1.....          | 24 |

## Simbologia e notações

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Acetil-CoA               | Acetilcoenzima A                                     |
| $(\text{CH}_2)\text{CO}$ | Acetona  |
| COOH                     | Ácido Carboxílico                                    |
| AUC                      | Área sob a Curva                                     |
| $^{13}\text{C}$ – ureia  | Carbono 13 – Ureia                                   |
| CRDS                     | <i>Cavity RingDown Spectroscopy</i>                  |
| VOCs                     | Compostos orgânicos voláteis                         |
| $\lambda$                | Comprimento de Onda                                  |
| x                        | Comprimento do percurso de absorção                  |
| R                        | Constante de Rydberg                                 |
| $n_{\text{min}}$         | Densidade Molecular                                  |
| $\text{CaF}_2$           | Diofluoreto de cálcio                                |
| E                        | Energia  |
| LiF                      | Fluoreto de lítio                                    |
| $\text{H}_3\text{O}^+$   | Ião Hidrónio   |
| ISA                      | <i>Institute for Storage Ring Facilities</i>         |
| UV1                      | Linha de feixe Ultravioleta do acelerador sincrotrão |
| Mb                       | Mega bar ( $10^{-18} \text{ cm}^2$ )                 |
| $\mu\text{J}$            | Microjoule   |
| n                        | Número quântico principal                            |
| ppbv                     | Partes por Bilião por Volume                         |
| ppb                      | Partes por Bilião                                    |

|            |  |
|------------|--|
| pptv       | Partes por Trilião por Volume                            |
| ppmv       | Partes por Milhão por Volume                             |
| <i>l</i>   | Percurso ou extensão da absorção                         |
| PMT        | <i>Photon Multiplier Tube</i>                            |
| DMAPP      | Pirofosfato de Dimetilalilo ou Difosfato                 |
| PTR-MS     | <i>Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry</i>        |
| SR         | Radiação Sincrotrão                                      |
| $\sigma$   | Reflexão/secção eficaz absoluta de Foto-absorção         |
| s          | Segundos   |
| T          | Temperatura  |
| UBT        | Teste de Respiração da Ureia ( <i>Urea Breath Test</i> ) |
| UVV        | Ultravioleta do Vácuo                                    |
| $A_{\min}$ | Valor mínimo da absorvância                              |

## **1 Enquadramento Histórico**

### **1.1 Breve Historia da relevância da Insulina no contexto da diabetes**

Em 1788, Thomas Crawley [1] foi o primeiro a relacionar a diabetes com o funcionamento inadequado do pâncreas. Em 1889, Paul Langerhans, médico alemão que viveu os últimos 10 anos da sua vida exercendo actividade clínica na Ilha da Madeira, identificou e isolou agrupamentos de células distribuídas no pâncreas que constituem apenas cerca de 1-2% desse órgão. Esses grupos de células, identificados erroneamente por Langerhans como linfonodos (ou gânglios linfáticos), são os locais de síntese de insulina mas no entanto não conseguiu relacioná-las com a diabetes. Estas foram mais tarde designadas por Ilhéus de Langerhans em homenagem aos seus estudos e descobertas. No mesmo ano de 1889, Minkowsky terá provocado diabetes em cães com a extracção prévia do pâncreas. Do registo dos seus trabalhos, fica a informação que este pensava que se administrasse um extracto de pâncreas a pessoas diabéticas os pacientes ficariam curados após o tratamento. Contudo, sabemos que não teve no sucesso nas suas experiências por dificuldades técnicas que não conseguiu ultrapassar.

Um cirurgião ortopedista, Frederick Banting e o seu assistente, um estudante de medicina, Charles Best, 30 anos mais tarde [1], trabalhando na Universidade de Toronto, Canadá, isolaram e prepararam um extracto de pâncreas obtido de um cão. Este extracto, depois de purificado, quando administrado em cães tornados diabéticos após pancreatectomia, comprovou baixar significativamente os níveis de glicémia.

Estava assim descoberta a primeira hormona capaz de ser utilizada para baixar os níveis de glicémia no sangue – a insulina.

A 23 de Janeiro de 1922 [1], a insulina foi administrada pela primeira vez a Leonard Thompson um jovem que se encontrava em coma diabético, tendo-se observado espantosos resultados clínicos. Em curto período de tempo baixava os níveis de glicémia, reduzida a glicosúria, desaparecia a cetonúria e havia uma rápida melhoria do seu estado geral.

Em Abril de 1922, foi-lhe dado o nome de “insulina” e os laboratórios Elli Lilly ofereceram a sua disponibilidade tecnológica para aperfeiçoar a molécula e para a sua produção em larga escala. Em novembro do mesmo ano a insulina era obtida bastante mais purificada a partir de ilhéus de pâncreas de vaca.

No mês de Janeiro de 1923 já era produzida insulina em quantidade suficiente que dava para abastecer os hospitais do Canadá, EUA e exportar para o estrangeiro.

O Prémio Nobel da Medicina de 1923 foi atribuído a Frederick Banting e a John J. McLeod, este último Director do Laboratório de Fisiologia da Universidade de Toronto, onde ambos trabalhavam. Banting dividiu metade do seu prémio com o seu colaborador Charles Best e McLeod com Collip.[1]

Alguns anos mais tarde, apurou-se também que um fisiologista romeno, Nicolae C. Paulesco, havia desenvolvido, em Bucareste, Roménia, uma técnica que permitia comprovar a secreção endócrina pancreática de insulina sensivelmente ao mesmo tempo que Banting [1] e com resultados semelhantes aos dos canadianos. Foi, no entanto, ultrapassado por estes últimos na purificação do extracto pancreático, que permitiu a sua aplicação ao homem e, também, na sua divulgação nos meios científicos internacionais. É hoje, também, reconhecido como co-descobridor da insulina.

## **1.2 Breve Historia da Diabetes Mellitus**

Um papiro descoberto num túmulo em Tebas, no Egipto, mais tarde adquirido pelo egiptólogo alemão George M. Ebers e, desde então, conhecido por Papiro de Ebers, constitui a mais antiga descrição do que hoje se considera a diabetes mellitus. O papiro de Ebers [2] foi escrito há 3500 anos num dos períodos mais brilhantes da cultura egípcia. O tratamento aconselhado consistia numa mistura de ossos, grãos de trigo, areia fresca, terra e água.

O termo *diabetes* tem a sua origem no grego e significa «passar através de», «atravessar», «sifão». Foi primeiramente utilizado na nomenclatura médica por Areteu da Capadocia há cerca de 2000 anos. A palavra *mellitus* tem origem no latim e significa «com sabor a mel», termo utilizado muito mais tarde. Os Gregos entenderam a diabetes como um defeito no nosso organismo que possibilitava a passagem dos líquidos pelo nosso corpo sem que este tivesse a capacidade de os reter. Verificaram que os diabéticos bebiam muitos líquidos quando descompensados e urinavam muito devido a essa incapacidade.

Ao longo dos séculos, para além de um diagnóstico mais ou menos correcto e de inúmeros tipos de tratamentos, não foi possível interferir no curso natural desta doença.

Só nos últimos 200 anos [2] se começou a perceber o que é a diabetes, quais as suas causas e as possibilidades de tratamento. Em 1860 um médico alemão – Paul Langerhans – descobriu um grupo de células no pâncreas, lugar onde, mais tarde, foram identificadas as células responsáveis pela produção de insulina. A descoberta deste grupo de células – denominadas posteriormente por ilhéus Langerhans – das quais fazem parte aquelas que são produtoras de insulina (chamadas células  $\beta$ ) permitiu um caminho rápido para o melhor conhecimento da diabetes e do seu tratamento.

Em 1926 um médico português – Ernesto Roma – funda em Lisboa a primeira associação de diabéticos do mundo, a Associação Protectora dos Diabéticos Pobres, e abre uma clínica onde desenvolve o que hoje se denomina «Educação Terapêutica».

Investigações posteriores levaram também à descoberta de que uma grande parte dos diabéticos não tem falta absoluta de insulina. Alguns produzem-na em quantidades normais ou até em excesso, mas insuficiente para as suas necessidades porque existe resistência à sua acção.

A diabetes mellitus tornou-se hoje num dos maiores problemas de Saúde Pública do mundo, pois o número de pessoas atingidas tem aumentado muito nas últimas décadas em especial nos países desenvolvidos e em vias de desenvolvimento. Estima-se, na Europa, um número de diabéticos que ronda os 30 milhões e para o ano 2025 cerca de 300 milhões em todo o mundo, tornando-se uma verdadeira pandemia [2]. Os três países com maior número de diabéticos serão, a Índia, a China e os EUA.

A diabetes aparece ainda como uma das primeiras causas de morbilidade e mortalidade, de elevados custos socioeconómicos na saúde (entre 6% e 10% do orçamento para a saúde é gasto com a diabetes) e tudo leva a crer que o problema se agravará na próxima década devido ao aumento da população, ao seu envelhecimento e à sua urbanização crescente [2].

### **1.2.1 O que é a diabetes?**

A diabetes é o resultado de uma deficiente capacidade de utilização pelo organismo da nossa principal fonte de energia – a glucose. Para que a glucose possa ser utilizada como fonte de energia, é necessária a insulina. Quando a produção ou acção de insulina é insuficiente ou até a combinação destes dois factores está presente no

nosso organismo, provoca uma taxa elevada de açúcar no sangue, ou seja, hiperglicemia.

Existem vários tipos de diabetes, mas de longe a mais frequente (90% dos casos) é a chamada diabetes tipo 2 [1].

### **1.2.2 O que é a diabetes tipo 2?**

Este tipo de diabetes é também conhecida como diabetes não insulino dependente (o excesso de gordura, sobretudo abdominal, contribui para esta insulino resistência e, conseqüentemente, para o aumento da glicémia), ocorre em indivíduos que herdaram uma tendência para a diabetes (frequentemente um familiar próximo) e que, devido a hábitos de vida e de alimentação errados, ou até mesmo o *stress*, vêm a sofrer de diabetes na fase adulta das suas vidas.

Na diabetes tipo 2, o pâncreas é capaz de produzir insulina. Contudo, a alimentação incorrecta e a vida sedentária, com ausência ou muito pouco exercício físico, tornam o organismo resistente à acção da insulina (insulino resistência), obrigando o pâncreas a trabalhar mais, até que a insulina que produz deixa de ser suficiente. É nessa altura que surge a diabetes.

### **1.2.3 O que é a diabetes tipo 1?**

A diabetes tipo 1, também conhecida como diabetes insulino dependente, é mais rara (não chega a 10% do total) [1] e atinge, na maioria das vezes, crianças ou jovens, mas podendo também aparecer em adultos ou até idosos. As células  $\beta$  do pâncreas deixam de produzir insulina, existindo uma destruição maciça destas células (as causas não são totalmente conhecidas), sabendo-se que o próprio sistema imunitário (mecanismo de defesa do organismo) do diabético ataca e destrói estas células. Devido a este facto, estes diabéticos necessitam de terapêutica de insulina para toda a vida.

### **1.2.4 Outros tipos de diabetes**

Além dos tipos apresentados e sem dúvida os mais relevantes, existe por exemplo a diabetes tipo MODY ( *Maturity-Onset Diabetes of the Young*), que afecta adultos jovens, mas também adolescentes e crianças. Apresenta-se com característica de diabetes tipo 2 e é causada por uma mutação genética que leva à alteração da



tolerância à glucose. As doenças do pâncreas, podem ainda ser causas raras de diabetes.

## 2 Relevância do ar exalado por humanos

### 2.1 Utilização como biomarcadores de doenças

A existência de testes de respiração como uma forma de diagnosticar doenças está presente desde o início da história da medicina. Os médicos sabiam que o odor do hálito do paciente está associado a algumas doenças, podendo levar a uma introspecção sobre processos fisiológicos e fisiopatológicos no corpo humano (Ma *et al.*, 2006). Por exemplo, o cheiro doce de acetona na respiração acompanha diabetes não controlada, um odor de peixe é o resultado de doença do fígado e um cheiro a urina semelhante ao odor de peixe está relacionado com a insuficiência renal. Em 1970 Linus Pauling [3] detectou (embora sem identificar) cerca de 200 diferentes compostos orgânicos voláteis (VOCs) no ar exalado por cromatografia gasosa. Provou que a respiração humana normal é um gás de composição bastante complexa. Há aproximadamente 3000 VOCs que foram detectados, pelo menos, uma vez na respiração humana, e a maioria das amostras de respiração normalmente contêm mais de 200 VOCs.

Verificou-se, nos últimos 30 anos, que muitos destes compostos foram identificados sendo que o ar exalado pode conter vestígios de compostos orgânicos voláteis, como metanol, acetona ou isopreno e mesmo pequenas moléculas inorgânicas como o óxido nítrico, o monóxido de carbono ou de sulfureto de carbonilo.

A análise do ar exalado tem sido proposta como método conveniente e seguro para complementar a amostragem de sangue e urina. É um procedimento não-invasivo, ou seja, com ausência de dor, e não requer pessoal médico qualificado. Apesar de até 3000 compostos poderem ser detectados no hálito de pessoas diferentes (Phillips *et al.*, 1999 a,b) [3], a matriz do ar exalado é menos complexa do que a do sangue ou outros fluidos corporais. Isto faz com que a análise da respiração seja mais simples de realizar.

Embora as evidentes vantagens que apresenta para o controlo biológico de rotina, ainda não foi apresentado como um meio de diagnóstico padrão na prática clínica. A razão, de os clínicos não utilizarem como meio de diagnóstico é a falta de separação de substâncias adequadas e simples, técnicas de identificação, e a falta de métodos de normalização. Além disso, o significado fisiológico e bioquímico da maior parte dos compostos voláteis não são ainda conhecidos.

Presentemente, as aplicações de rotina de testes de respiração típicos incluem a avaliação das concentrações de etanol e acetaldeído (este último como um produto metabólico de etanol) em gás expiratório após consumo de álcool.

O teste de respiração da ureia (*Urea Breath Test* (UBT)) [4] é um dos métodos não-invasivos mais importantes para a detecção de infecção por *Helicobacter pylori* (é uma espécie de bactéria que infecta a mucosa do estômago humano). O ensaio explora a hidrólise de ureia oralmente administrada pela enzima urease, no qual a *H. pylori* é produzida em grandes quantidades. A ureia é hidrolisada a amoníaco e dióxido de carbono, que se difunde para o sangue e é excretada pelos pulmões. A classificação do  $^{13}\text{C}$  – ureia é cada vez mais utilizada, porque este isótopo não-radioativo é inócuo e pode ser usado com segurança em crianças e mulheres em idade fértil.  $^{13}\text{C}$  - ureia ou amoníaco são consideradas as técnicas mais sensíveis e específicas para o diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori*. Outro teste pode incluir a determinação de Óxido Nítrico utilizado para reconhecer a asma (Ochiai *et al.*, 2001) [3,5], a asma é uma doença inflamatória, contudo a inflamação das vias aéreas não tem sido mensurável na prática clínica. A avaliação do Óxido Nítrico exalado é uma nova técnica simples, reproduzível e bem aceite pelos doentes, com utilidade bem demonstrada no diagnóstico de asma. No entanto, o seu interesse principal será provavelmente na monitorização da evolução e do tratamento da asma, onde poderá permitir uma objectivação sensível e precoce da alteração do estado inflamatório das vias aéreas.

Uma das aplicações mais interessantes para os clínicos, seria a detecção do cancro de pulmão. É uma das principais causas de morte entre os adultos e a sua incidência está a aumentar globalmente. Foram realizados estudos a fim de caracterizar as substâncias em amostras de respiração de pacientes com e sem cancro de pulmão (O'Neill *et al.*, 1988; Petri *et al.*, 1988; Phillips *et al.*, 1999 a,b; Deng *et al* 2004 a; Poli *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2006) [3]. Em 1988, dois grupos de investigadores relataram separadamente alguns VOCs como substâncias potenciais de marcação em patologias cancerígenas do pulmão. Mais tarde, Phillips *et al.* 1999a, b [3] sugeriu uma combinação de 22 compostos orgânicos voláteis, incluindo na respiração alcanos metilados e derivados de benzeno, para detecção de cancro de pulmão. Existe uma considerável evidência que suporta a hipótese de que o stress oxidativo pode estar associado com o cancro do pulmão. Uma limitação da pesquisa é que apenas algumas amostras clínicas foram estudadas, o que não permite utilizar esses resultados como indicadores estatísticos, pois ainda não existe em quantidade

suficiente. Apesar de as concentrações de VOCs como marcadores de cancro de pulmão diferirem em relatórios diferentes, os resultados obtidos mostram que existem variações significativas na composição da respiração entre os pacientes com cancro de pulmão e saudáveis. Portanto, são necessários mais estudos para confirmar a utilidade de VOCs para detectar cancro de pulmão na população geral, estudos realizados por Phillips *et al.*, 1999 a,b. [3].

A tabela 1 mostra outros compostos voláteis que podem ser utilizados para reconhecer certas doenças.

Tabela 1. Alguns exemplos de marcadores de doenças.  
(Amann *et al.*, 2005)

| VOCs   | Patologia                  |
|--|----------------------------|
| <b>Etano e pentano</b>   | Stress oxidativo           |
| <b>Hidrocarbonetos metilados</b>                                       | Neoplasia do pulmão e mama |
| <b>Hidrocarbonetos (especialmente etano e pentano)</b>                 | Stress oxidativo           |
| <b>Isopreno</b>  | Metabolismo do colesterol  |
| <b>Acetona</b>   | Diabetes mellitus,         |
| <b>Compostos contendo enxofre (e.g. (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S)</b> | Disfunção hepática         |
| <b>Compostos contendo nitrogénio (Amoniaco, NH<sub>3</sub>)</b>        | Disfunção renal e uremia   |

## 2.2 Concentrações em ar exalado

Alguns VOCs com concentrações relativamente elevadas no ar exalado por humanos saudáveis (concentrações medias apresentam-se em parênteses), foram reportados por Turner *et al.*, 2006a-b: amónia (833 ppb), acetona (477 ppb), isopreno (106 ppb), metanol (461 ppb), etanol (112 ppb), propanol (18 ppb) e acetaldeído (22 ppb). No entanto, a maior parte dos VOCs no ar exalado têm gamas de concentrações típicas que são mais baixas do que 1 ppb. As concentrações de compostos orgânicos voláteis no hálito não são geralmente mais elevadas no estado de doença, quando comparado com voluntários saudáveis. É o caso de algumas espécies importantes moleculares, tais como acetona, para a diabetes não tratada ou isopreno (em alguns casos) e a amónia para a insuficiência renal.

### 2.3 Exemplos de biomarcadores voláteis

A respiração exalada inclui pequenos compostos inorgânicos, tais como NO, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, compostos orgânicos voláteis (e.g. hidrocarbonetos, álcoois, cetonas, aldeídos, ésteres) e as substâncias não voláteis, tais como os isoprostanos, citocinas, leucotrienos e peróxido de hidrogénio, os quais pode ser encontrados na respiração do ar condensado. Os VOCs no gás pulmonar da respiração humana incluem acetona, isopreno, etanol, metanol e outros álcoois, bem como alcanos. É bem conhecido que os perfis dos produtos voláteis da respiração em doentes que sofrem de determinadas doenças são diferentes do perfil de compostos orgânicos voláteis de indivíduos normais (ou saudáveis). Mas a fonte e a função fisiológica da maioria dos compostos orgânicos voláteis, no entanto, não são ainda conhecidos. Na maioria dos casos, percursos metabólicos específicos que dão origem à sua exalação são desconhecidos. Alguns compostos orgânicos voláteis em gases de respiração derivam a partir do ambiente, uma vez que podem ser absorvidos na forma de contaminantes através da pele ou absorvidos por via de inalação ou ingestão. Estes compostos são, possivelmente, metabolizados no corpo, e posteriormente excretados pela expiração. Outros VOCs são gerados no corpo, como produtos de processos metabólicos ou pela actividade de bactérias intestinais. Estes podem vir a ser utilizados como Biomarcadores endógenos mas ainda não são utilizados para fins de diagnóstico. Um resumo das origens fisiológicas seleccionadas de moléculas endógenas na respiração é apresentado na tabela 2 [3]. Factores que afectam a grande variabilidade na composição da respiração humana incluem as condições físicas, estado geral de saúde, a ingestão de alimentos, as influências ambientais e estilo de vida global.

Tabela 2. Os compostos voláteis de origem fisiológica

| Composto           | Origem Fisiológica  |
|--------------------|---|
| <b>Acetaldeído</b> | Metabolismo do etanol (Norberg <i>et al.</i> , 2003; Turner <i>et al.</i> , 2006) |
| <b>Acetona</b>     | Descarboxidação do acetoacetato e Acetil - CoA                                    |
| <b>Etano</b>       | Peroxidação lipídica (Schubert <i>et al.</i> , 2004)                              |
| <b>Etileno</b>     | Peroxidação lipídica (Risby, 2005)  |
| <b>Hidrogénio</b>  | Bacteria intestinal (Ledochowski <i>et al.</i> , 2001)                            |
| <b>Isopreno</b>    | Biossíntese do colesterol (Stone <i>et al.</i> , 1993)                            |
| <b>Metano</b>      | Bacteria intestinal (Ledochowski <i>et al.</i> , 2001)                            |
| <b>Metilamina</b>  | Metabolismo proteico (Risby, 2005)  |
| <b>Pentano</b>     | Peroxidação Lipídica (Schubert <i>et al.</i> , 2004)                              |

### 2.3.1 Acetona

A acetona, como foi dito anteriormente é um dos mais abundantes VOCs, detectado na respiração humana. Durante o processo de oxidação dos ácidos graxos (é um ácido carboxílico (COOH) produzido quando as gorduras são quebradas, é pouco solúvel em água) no fígado dos seres humanos e na maioria dos outros mamíferos, o acetil-CoA (acetilcoenzima A) formado pode entrar no ciclo de Krebs ou pode ser convertido nos conhecidos “corpos cetónicos”, ou seja, em acetoacetato, D-β-hidroxiacetato e acetona, que são enviados para outros tecidos através da circulação sanguínea [6].

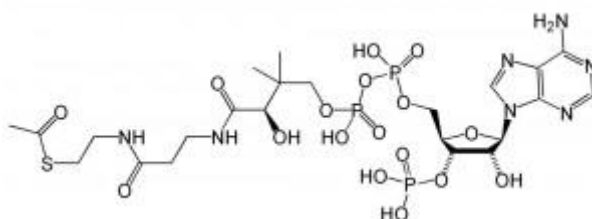


Ilustração 1. Acetil-CoA (acetilcoenzima A)

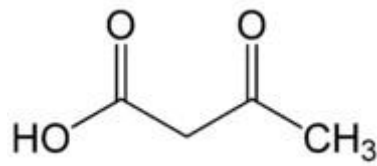


Ilustração 2. Acetoacetato

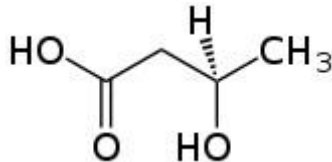


Ilustração 3. D-β-hidroxibutirato

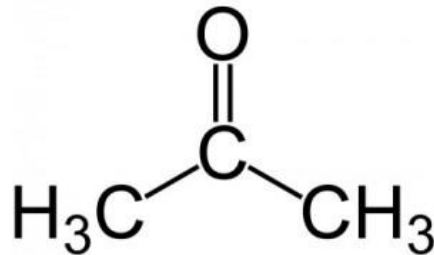


Ilustração 4. Acetona

Sendo produzida em menor quantidade do que os outros compostos, a cetona é exalada. O acetoacetato e o D-β-hidroxibutirato são transportados pelo sangue até alcançarem os tecidos extra-hepáticos (por exemplo, músculos esqueléticos, cardíaco, córtex renal), onde ocorre a oxidação desses compostos por meio da via do ciclo de Krebs para fornecer grande parte da energia requerida por esses mesmos tecidos. O cérebro, que normalmente usa apenas a glicose como combustível, em condições de necessidade (fome), quando a glicose não está disponível, pode adaptar-se para utilizar o acetoacetato ou o D-β-hidroxibutirato na obtenção de energia.

A disponibilidade de oxalacetato para iniciar a entrada do acetil-CoA no ciclo de Krebs, é o principal factor determinante da via metabólica que será tomada pelo acetil-CoA na mitocôndria do fígado. Em certas circunstâncias, como no jejum, as moléculas de oxalacetato são retiradas do ciclo do ácido cítrico e utilizadas na síntese de moléculas de glicose (gliconeogénese). Quando a concentração de oxalacetato está muito baixa,

pouco acetil-CoA entra no ciclo de Krebs e, assim, a formação de corpos cetónicos é favorecida [6].

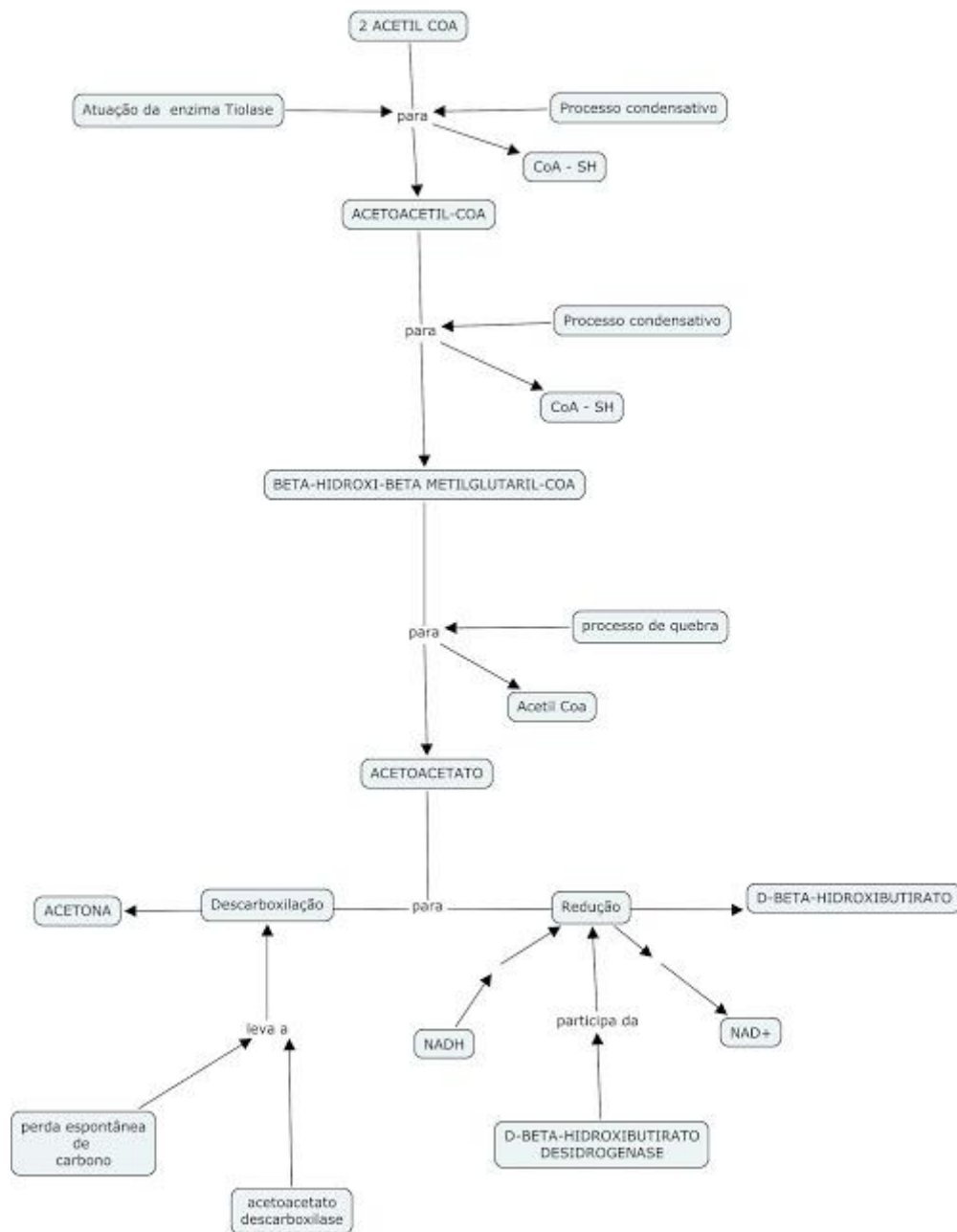


Ilustração 5. Esquema de formação dos corpos cetônicos [7]



Os corpos cetônicos são compostos derivados do Acetil-CoA no momento em que este deixa de entrar no ciclo de Krebs para formar corpos cetônicos, que podem ser dos seguintes tipos:

- Acetona: é exalada;
- Acetoacetato: dissolvido no sangue e transportado para tecidos extra-hepáticos onde será oxidado pela via do ciclo do ácido cítrico para formar a maior parte da energia requerida por esses tecidos.
- D- $\beta$ -hidroxibutirato: tem o mesmo destino do acetoacetato.

Consequência clínica:

Como as pessoas diabéticas não-tratadas produzem grande quantidade de acetoacetato, implica que o sangue contenha quantidades significativas de acetona. A acetona é volátil e confere um odor característico ao ar exalado, o que, por vezes, é útil no diagnóstico da severidade da doença.

### 2.3.2 Isopreno

Um dos VOCs mais comuns no ar expirado é o isopreno, que está presente entre os hidrocarbonetos na respiração humana nas concentrações mais altas. É sintetizado como um precursor de muitos compostos importantes e está sempre presente na respiração humana. O isopreno é formado ao longo do processo metabólico do colesterol [3]. Em ratas, o isopreno citosol hepático é produzido por uma reacção de eliminação catalisada por ácido a partir de pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). Em certas plantas, esta reacção é catalisada por uma enzima contendo  $Mg^{2+}$ . Em tecidos de mamíferos, o isopreno pode ser produzido através de uma reacção catalisada pelo  $Mg^{2+}$  isomerase pirofosfato dependente do isopentenil. Esta enzima catalisa a interconversão de pirofosfato de isopentenilo e pirofosfato dimetilalilo. Outra possível fonte de isopreno é radicalmente mediada na peroxidação *in vivo* de esqualeno. O isopreno foi identificado como marcador de distúrbios no metabolismo do colesterol, tais como a hipercolesterolemia. Hoje sabe-se que a concentração de isopreno no organismo humano aumenta até aos 25 anos de idade, e é significativamente mais baixa em crianças. Seria interessante saber se a excreção de isopreno pelos pulmões tem algum fundo metabólico (em vez de apenas ser um subproduto accidental da biossíntese do colesterol).

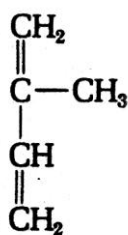


Ilustração 6. Estrutura do Isopreno

### 3 Medição de compostos orgânicos voláteis na respiração humana

Foi feita uma tentativa para determinar se os compostos orgânicos voláteis na respiração são derivados interna ou externamente do corpo humano, isto é, eram produtos de metabolismo ou de contaminantes provenientes do meio ambiente. A concentração foi medida em 24 VOCs mais abundantes no ar alveolar de 12 voluntários normais e também no ar que era inspirado. A polaridade dos gradientes médios alveolares (concentração na respiração menos concentração no ar inspirado) foi positiva em 15 VOCs e negativa em 9. O gradiente alveolar médio varia desde fortemente positivo (por exemplo, 2,3,3 - trimetilpentano), consistente com o metabolismo produzido no corpo, a fortemente negativo (por exemplo, o isopreno), consistente com a ingestão de um aparelho de ar poluente, que foi em seguida, catalisado (parte do metabolismo que se refere à assimilação ou processamento da matéria orgânica adquirida pelos seres vivos para fins de obtenção de energia) *in vivo* ou excretado através de uma via extra-pulmonar. A ilustração 7 mostra gradientes alveolares dos VOCs mais abundantes na respiração: as barras sólidas indicam o gradiente médio alveolar de VOC na respiração de indivíduos normais; barras de erro indicam erro padrão da média. As unidades são AUC dos picos cromatográficos. Polaridade positiva indica fabricação provável no corpo, polaridade negativa indica uma origem ambiental provável.

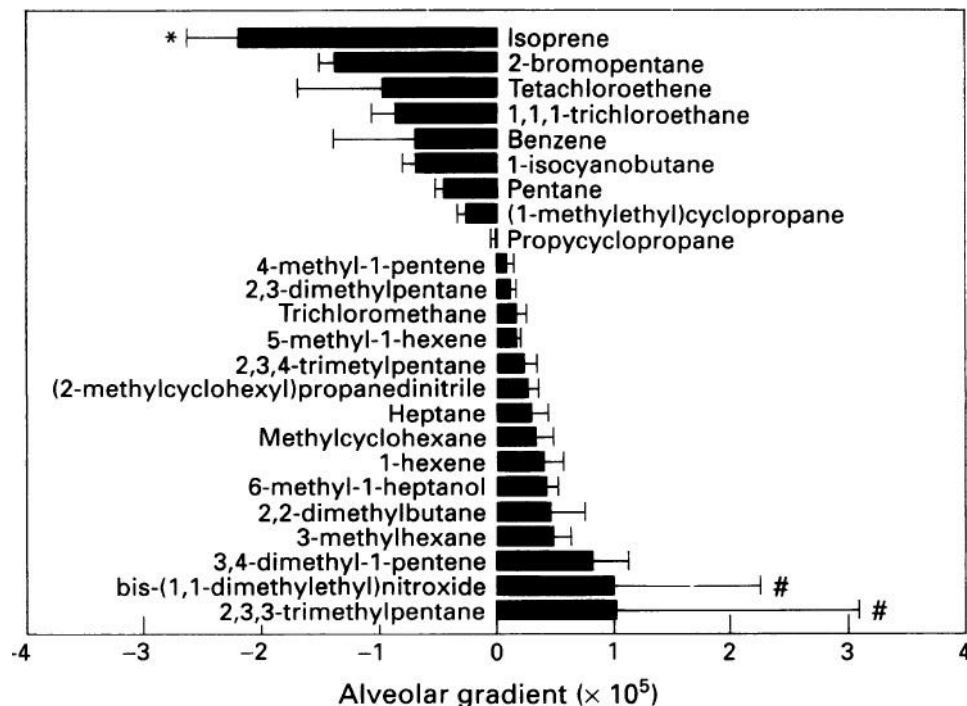


Ilustração 7. Gradientes alveolares dos VOCs mais abundantes na respiração. Adaptado de [8]

Os VOCs na respiração podem ser originários do lado de dentro ou do lado de fora do corpo, como produtos endógenos do metabolismo ou de fontes exógenas, tais como ar, água e alimentos. Estudos prévios dos VOCs em respiração alveolar em geral não têm abordado a questão da sua fonte primária. A distinção entre a origem endógena e exógena de um VOC assumiu maior importância nos últimos anos, com o reconhecimento de que a composição dos compostos orgânicos voláteis na respiração pode ser substancialmente alterada em condições tais como o cancro do pulmão, insuficiência hepática, enfarte agudo do miocárdio, e esquizofrenia [8].

Com base no que é conhecido da fisiologia da troca gasosa pulmonar, a polaridade do gradiente alveolar parece depender, principalmente, no facto da origem de um VOC ser a partir do lado de dentro ou do lado de fora do corpo. Um VOC difunde através da membrana alveolar pulmonar, a partir do compartimento com a pressão de vapor mais elevada para a mais baixa, a partir do ar para o sangue, ou vice-versa. O equilíbrio entre os VOCs no sangue e no ar alveolar é rápido e provavelmente quase completo. As potenciais vias de fontes de VOCs na respiração são mostradas na Ilustração 8, em que mostra que VOCs no ar podem ser derivados de fontes quer no interior do

corpo (como produtos do metabolismo), ou fora do corpo (VOCs no ar inspirado, alimentos e medicamentos). [8].

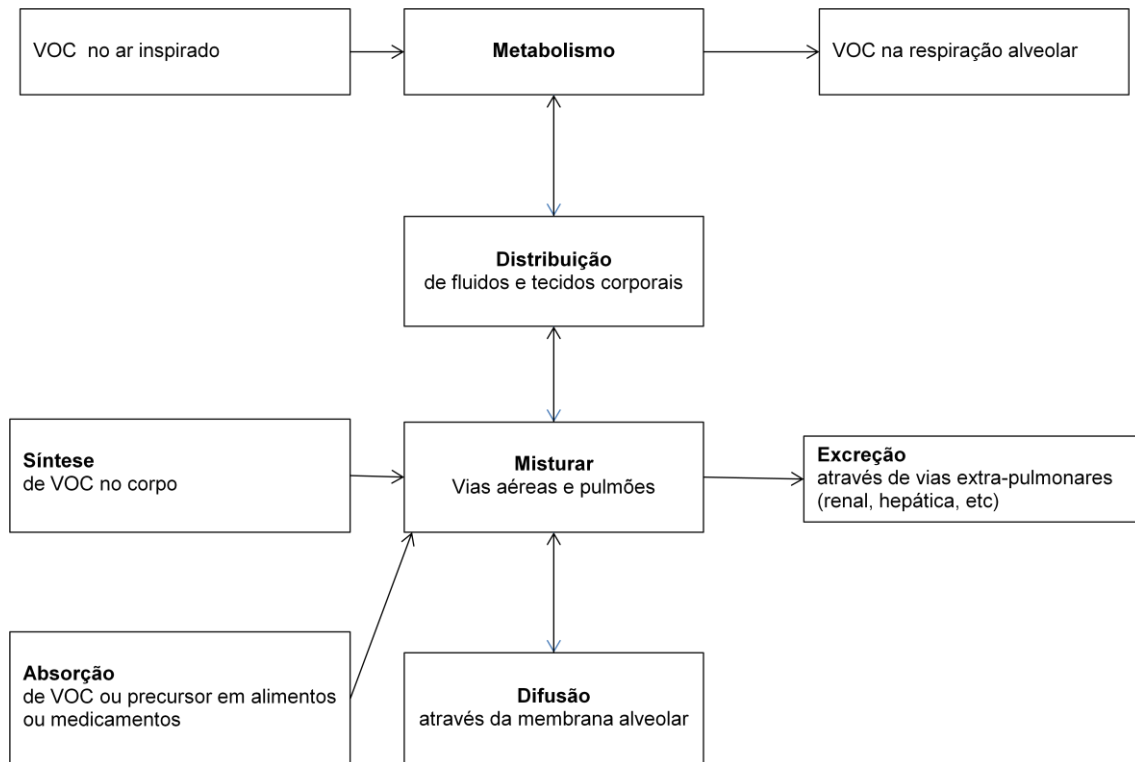


Ilustração 8. Fontes de VOCs na respiração alveolar.  
Adaptado de [8]

Um gradiente alveolar positivo indica que existem mais VOCs excretados do que ingeridos através dos pulmões: por conseguinte, estes compostos orgânicos voláteis são sintetizados no organismo, ou de outro local de absorção, possivelmente um medicamento ou um alimento. Por outro lado, um gradiente negativo indica que um alvéolo de VOCs provenientes do exterior do corpo, foi ou catalisado ou excretado através de uma via extra-pulmonar (tal como os rins ou o fígado). A situação é menos clara em relação aos compostos orgânicos voláteis com gradientes alveolares próximos de zero. Estes compostos podem ter sido poluídos no ar e não foram significativamente catalisados ou excretados, de modo que suas concentrações no sangue e no ar eram mais ou menos iguais. Estes resultados mostram, pela primeira vez, que os gradientes alveolares dos VOCs mais abundantes na respiração podem

mostrar uma polaridade positiva ou negativa, de acordo com o facto de serem de origem endógena ou exógena.

A título exemplificativo, são apresentados os valores dos três VOCs mais comuns na respiração: acetona, isopreno e metanol. As suas concentrações medidas na respiração são o resultado de um número de 20 ciclos de inspiração/expiração onde se espera ter sido atingido um patamar. A proporção média de concentração de patamar para a concentração única da respiração exalada foi de  $1,92 \pm 0,57$  para isopreno,  $1,25 \pm 0,13$  para a acetona e  $1,12 \pm 0,12$  para o metanol (média  $\pm$  desvio padrão) [9].

Centenas de compostos orgânicos voláteis (VOCs) que se formam no organismo, foram identificados na respiração, em concentrações que variam a partir de partes por bilião por volume (ppbv) a partes por milhão por volume (ppmv). Alguns destes são conhecidos como marcadores característicos de doença. No cerne do conceito de análise da respiração para o diagnóstico médico a ideia de que a concentração de VOCs em gases de respiração é um reflexo da concentração de VOCs no sangue, e a concentração de VOCs no sangue é um reflexo de processos metabólicos que ocorrem no organismo, postula-se que certos estados de doença irão dar origem à actividade metabólica na qual, por sua vez, leva a um aumento, ou, em alguns casos, a uma diminuição dos níveis de diferentes compostos no sangue. A reprodutibilidade de cinco ensaios consecutivos para dois indivíduos foi medida e verificou-se estar dentro de 12% para a acetona, o metanol, acetaldeído e vapor de água, mas a menos de 30% para o isopreno [9].

O efeito da interacção das vias aéreas e dinâmica do sistema respiratório e cardiovascular na amostragem final é muitas vezes uma medida de um sistema num estado dinâmico. Enquanto o equilíbrio pode ter sido estabelecido entre a concentração de VOC no sangue arterial e no ar alveolar no final da inspiração, este equilíbrio não existe mais no momento em que o ar é exalado. Se variações significativas na concentração de gás no ar são artefactos do processo de amostragem, a utilidade de análise de respiração para diagnóstico é questionável.

Adicionalmente, a técnica de *Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry* (PTR-MS) é um tipo de espectrometria de massa de ionização química na qual a ionização depende da transferência de um protão de iões hidrónio (água protonada),  $H_3O^+$  a uma molécula neutra. Os iões  $H_3O^+$  são produzidos numa fonte de cátodo oco de descarga, em seguida passam para uma câmara de reacção em que a amostra de ar a ser

analisada é introduzida. Aqui, os VOCs neutros da amostra de gás reagem com os iões  $\text{H}_3\text{O}^+$ . A energia cinética de translação de iões na câmara de reacção pode ser controlada alterando ou a intensidade do campo eléctrico através dele, ou a pressão no seu interior. O parâmetro relevante é  $E / N$ , i.e. a razão entre a intensidade do campo eléctrico ( $E$ ) para a densidade de número total de moléculas ( $N$ ). Reduzir  $E / N$  reduz a energia da colisão, fazendo a fragmentação de iões moleculares menos provável. No entanto, o aumento de  $E / N$  tem o efeito benéfico de reduzir a formação de água de agregados iónicos  $\text{H}_3\text{O}^+ \text{H}_2\text{O}^+_n$  ( $n = 1, 2, \dots$ ). Isto é especialmente importante na análise da respiração, como os resultados de respiração húmida que na formação de iões tem mais água do que na fragmentação de uma amostra de gás seco [9].

## 4 Dispositivo experimental

### 4.1 Introdução

Este capítulo é dedicado à descrição do aparelho utilizado para estudar a espectroscopia de foto-absorção de UVV (ultravioleta do vácuo) utilizando radiação sincrotrão.

A radiação ultravioleta e visível é importante para caracterizar e estudar a espectroscopia molecular. A energia dos fótons nessas regiões de comprimento de onda é maior que alguns eV e suficiente para causar excitação electrónica, em que a região do espectro electromagnético, abaixo de 180 nm ( $> 6,9$  eV) é conhecida como ultravioleta do vácuo (UVV).

### 4.2 Radiação Sincrotrão

A utilização de radiação sincrotrão (SR) no estudo de espectroscopia molecular é extremamente importante porque é possível obter radiação intensa, coerente e altamente colimada e altamente polarizada no plano do anel de armazenamento com alta resolução espectral. Esta alta intensidade e ampla faixa espectral quando combinada com outras propriedades, como alto grau de polarização e colimação torna a SR uma ferramenta poderosa para a pesquisa básica e aplicada em física, química, biologia e medicina, bem como para encontrar aplicações em tecnologias como litografia de Raios-X, caracterização de materiais e micromecânica. Nos presentes estudos, a radiação UV utilizada, permite evidenciar características próprias das moléculas fornecendo resultados da espectroscopia do sistema molecular, que inclui informação sobre a valência e os estados de Rydberg. O conhecimento das secções eficazes absolutas de foto-absorção também é extremamente necessário, se quisermos avaliar o papel desses sistemas moleculares na atmosfera terrestre onde podem estar sujeitos a mecanismos de fotólise.

#### 4.2.1 ASTRID radiação sincrotrão, Dinamarca

A instalação de radiação sincrotrão utilizada para estudar o sistema molecular nesta tese é o ASTRID - feixe de luz UV1 (Ilustração 9.), no ISA – *Institute for Storage Ring Facilities*, nas Instalações da Universidade de Aarhus, Dinamarca - [www.isa.au.dk](http://www.isa.au.dk)



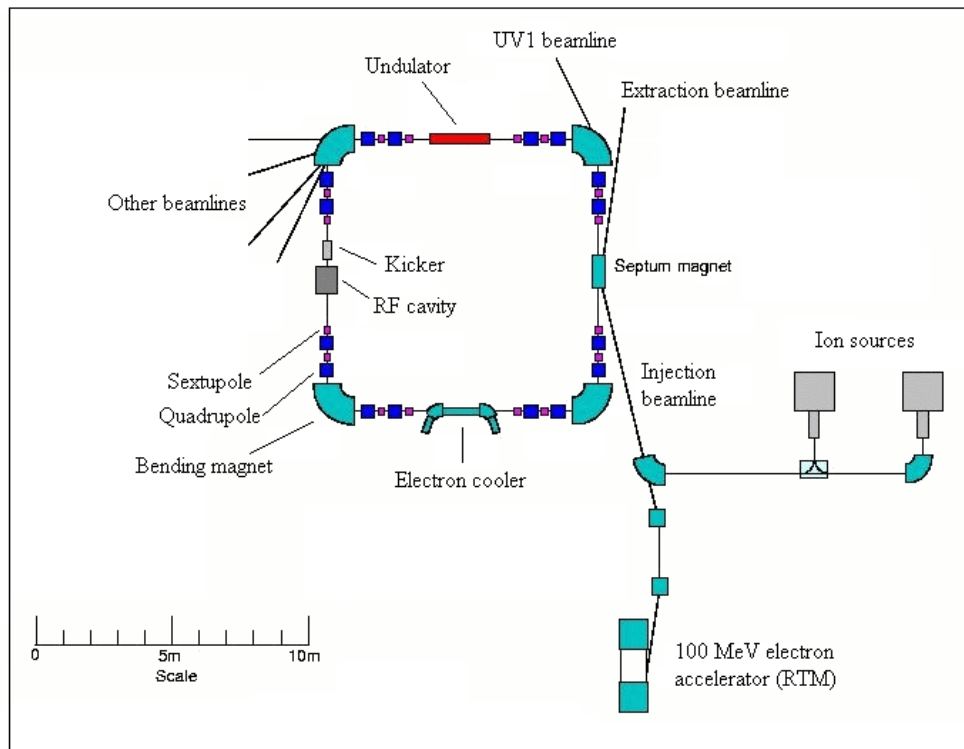


Ilustração 9. Representação esquemática do acelerador Sincrotrão  
(adaptado de [www.isa.au.dk](http://www.isa.au.dk)).

Quando um campo magnético é aplicado normal a um feixe de electrões que viaja a velocidades relativistas, a deflexão da sua trajectória recta irá ocorrer (trajectórias curvas), perdendo estes alguma energia por efeito de *bremsstrahlung* e produzindo-se a emissão de radiação que neste caso se denomina de sincrotrão (Ilustração 10.). A radiação emitida é extremamente intensa e estende-se segundo uma vasta gama de comprimentos de onda, desde o infravermelho, visível, ultravioleta e para as regiões dos Raios-X moles e duros do espectro electromagnético. Em seu modo de armazenamento de electrões, o acelerador ASTRID funciona como uma fonte de radiação sincrotrão (SR), capaz de produzir cerca de 150 mA com tempos de vida de feixe superiores a 15 horas.



Ilustração 10. Diagrama esquemático de radiação Síncrotrão.

A linha de feixe UV1 (Ilustração 11.) foi projectada para operar no intervalo de comprimentos de onda 100 nm a 700 nm (1,8 eV – 12,4 eV), e tem a capacidade de fornecer um fluxo típico de  $2 \times 10^{11}$  *fótons*  $s^{-1}$ . Com a finalidade de efectuar estudos espectroscópicos significativos, é necessário ter a capacidade de seleccionar um único comprimento de onda de radiação a partir da propagação contínua de comprimentos de onda e para tal necessita-se de um monocromador.

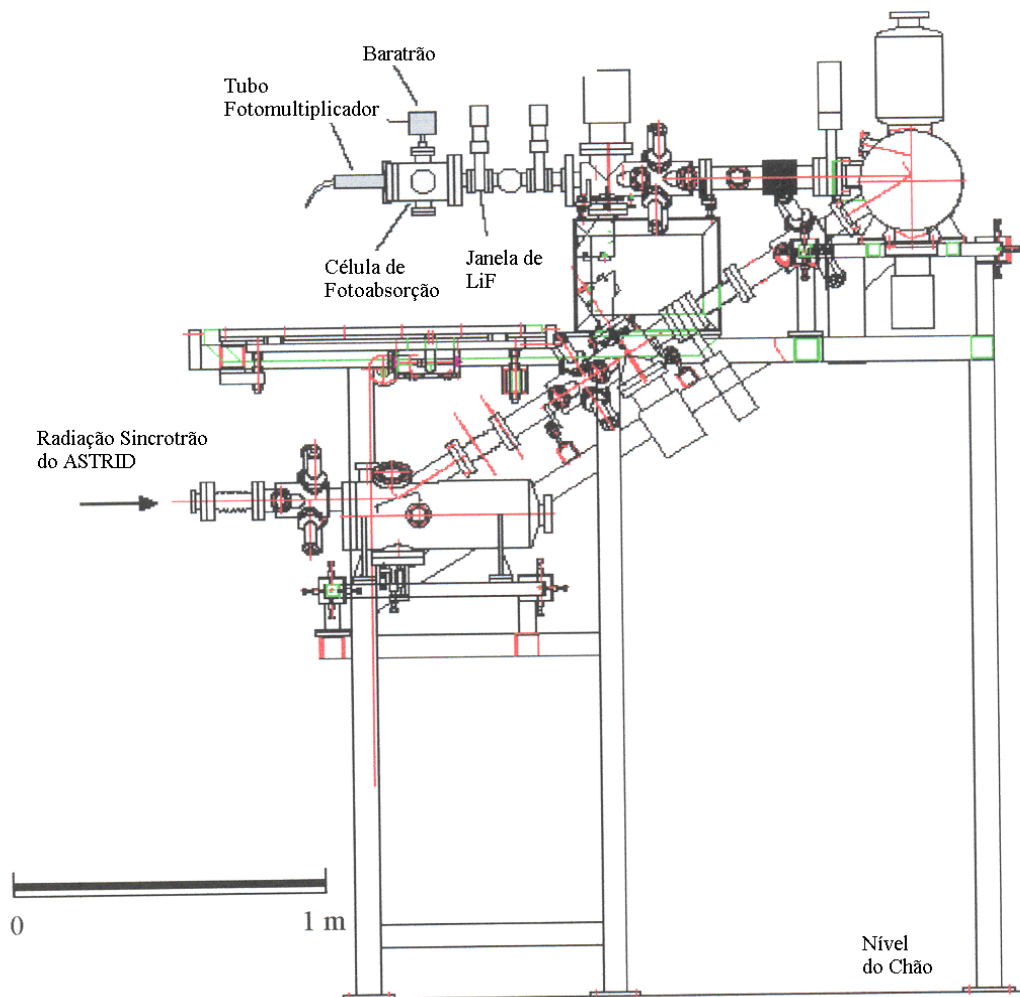


Ilustração 11. Linha do de feixe de luz UV1.

A linha do feixe UV1, foi a linha onde se realizou o estudo espectroscópico da molécula de acetona. A radiação síncrotron produzida no anel de armazenamento ASTRID, é conduzida ao sistema de fotoabsorção UV1 através de dois espelhos toroidais, um deles actuando como monocromador. A radiação UVV passa assim através de duas janelas de transmissão, de LiF e CaF<sub>2</sub>, para uma câmara de gás fechada, com um percurso de absorção de 25 cm de comprimento. A radiação UVV é posteriormente detectada num fotomultiplicador, e a pressão medida por um sensor do tipo Baratrão.

#### 4.2.2 Monocromador UV1

O monocromador foi concebido para proporcionar um elevado fluxo de fótons com uma resolução moderada ( $1000 < R < 5000$ ) enquanto preserva o elevado grau de polarização linear da fonte de radiação síncrotrão. A Ilustração 12 apresenta um esquema da linha de feixe UV1. A linha de feixe é constituída por dois elementos ópticos: um pré-espelho toroidal, que fornece focagem vertical e horizontal independente e uma rede de difracção toroidal côncava curva para dispersar a radiação síncrotrão. São necessárias duas redes de difracção para cobrir o intervalo de comprimentos de onda propostos enquanto é mantida resolução suficiente (Tabela 3). A largura das fendas de entrada e saída podem ser ajustadas de forma a escolher diferentes larguras de bandas de fótons. A fim de manter a focagem correcta na fenda de saída à medida que a grelha de difracção roda, é necessário fazer a translação da fenda de saída. Esta translação é mecanicamente ligada à plataforma experimental onde a experiência é montada, e pode alcançar cerca de 65 cm para a gama de comprimentos de onda a varrer.

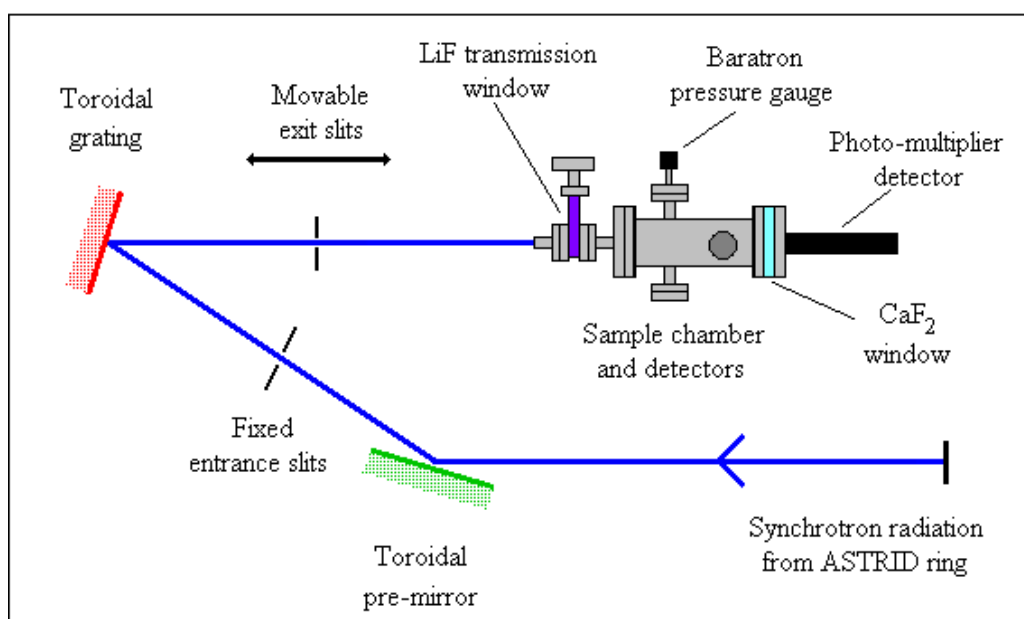


Ilustração 12. Diagrama esquemático da linha de Luz UV1.

Tabela 3. Especificações ópticas da linha UV1.

| Óptica  | Raio maior (m) | Raio menor (m) | Área Activa (mm <sup>2</sup> ) | Intervalo de energia de fótons (nm), (eV) |
|---|----------------|----------------|--------------------------------|---|
| <b>Primeiro Espelho</b>                       | 3.947          | 0.3657         | 120 × 50                       | -   |
| <b>Rede de difracção 1<br/>1000 Linhas/mm</b> | 1.0            | 0.7755         | 40 × 40                        | 700 nm – 200 nm<br>(1.8 eV – 6.2 eV)      |
| <b>Rede de difracção 2<br/>2000 Linhas/mm</b> | 1.0            | 0.7755         | 40 × 40                        | 350 nm – 100 nm<br>(3.5 eV – 12.4 eV)     |

O monocromador utilizado ao longo desta tese para as experiências de alta resolução permite varrer os comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 110 nm - 350 nm utilizando a grelha 2, sendo possível alcançar uma resolução de 0,075 nm.

#### 4.2.3 UV1 câmara de foto - absorção

Todas as medições de foto-absorção de alta resolução realizada nesta tese foram obtidas numa câmara de gás fechada, com um percurso de absorção de 25 cm de comprimento. A câmara de absorção é uma cruzeta de seis vias disponível comercialmente com uma capacidade de ~ 1,2 litros e é mostrada esquematicamente na Ilustração 13.

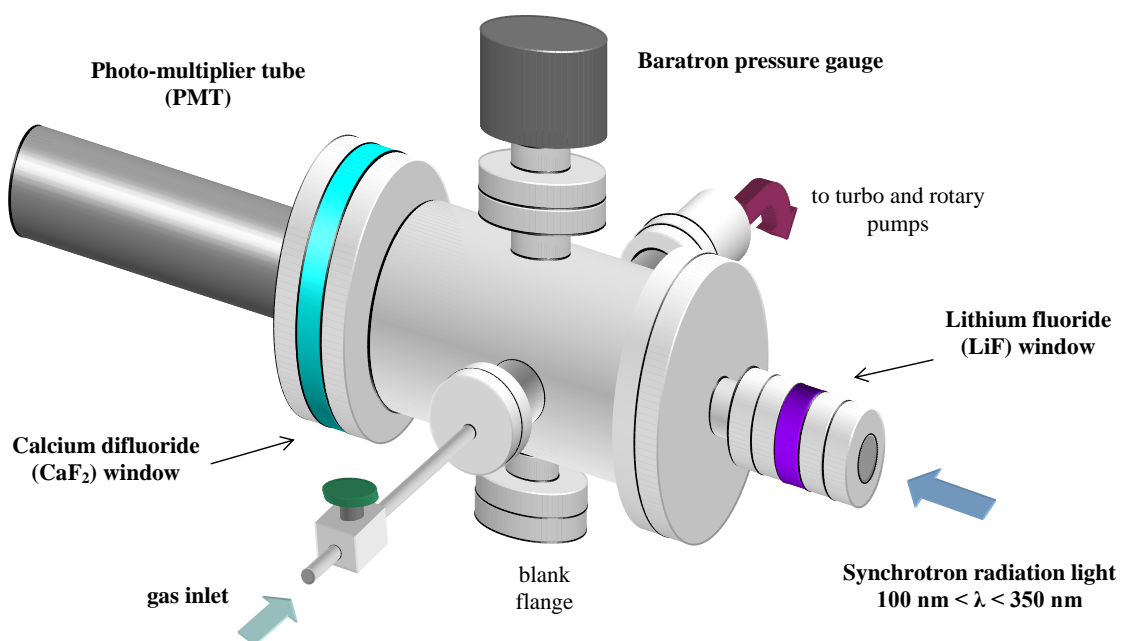


Ilustração 13. A célula foto-absorção.

Um manómetro do tipo baratrão (MKS 390HA - 00001, 1 torr) está montado na parte superior da câmara. No lado lateral, um tubo de aço inoxidável de  $\frac{1}{4}$  " é ligado a uma flange DN40 CF para a admissão de gás através de duas válvulas (Swagelok SS-4H-TH3 e Nupro SS-4H), por sua vez ligados ao reservatório de amostra. A câmara é evacuada por uma bomba turbomolecular TURBOVAC de 50 litros / s apoiada por uma bomba rotativa Leybold D49. Os escapes de gases a partir do sistema rotativo estão ligados ao sistema central de exaustão do laboratório. As janelas de transmissão de fluoreto de lítio (LiF) e de diofluoreto de cálcio ( $\text{CaF}_2$ ), definem respectivamente a entrada e saída da célula de foto-absorção limitando esta última a transmissão do feixe de fótons abaixo de 113 nm . O foto-multiplicador (PMT-*Photon Multiplier Tube*) QL30F/RFI é colocado atrás da janela de  $\text{CaF}_2$  para a detecção de fótons. Um fluxo constante de hélio é mantido entre a janela de saída de  $\text{CaF}_2$  e o PMT para evitar a absorção de oxigénio molecular, o que poderia conduzir a erros na determinação da secção eficaz de foto-absorção medidos. O aparelho é calibrado usando  $\text{O}_2$  e  $\text{SO}_2$ . A banda de absorção Schüman-Runge de  $\text{O}_2$  (6,9 eV - 9,5 eV) [10] é usada para calibrar o valor da secção eficaz absoluta porque a sua natureza ampla minimiza o efeito de qualquer alteração na resolução de energia (Ilustração 14). Por seu lado, o  $\text{SO}_2$  é usado para calibrar a escala de energia, uma vez que tem bandas de absorção claramente definidas com conjuntos de picos de absorção nas gamas de 3,8 a 5,1 eV [12] e 5,15 eV a 7,25 eV [11] (Ilustração 15).

Na obtenção dos espectros de foto-absorção, é preciso ter grande cuidado para garantir que não há efeitos de luz de segunda ordem que contribuam com características de absorção. Os comprimentos de onda mínimos e máximos entre as quais são realizadas verificações, 113 nm a 320 nm (10,97 eV a 3,88 eV), são determinados pelas janelas de transmissão da câmara de gás e o intervalo de energia da grelha, respectivamente. A pressão da amostra é medida utilizando um manómetro do tipo Baratrão e variada de modo a fornecer o valor máximo de absorção evitando sempre os efeitos de saturação. A corrente de feixe anel sincrotrão é monitorizada ao longo da recolha de cada espectro uma vez que a corrente que circula no anel de armazenamento é directamente proporcional à intensidade da radiação sincrotrão produzido e decai lentamente ao longo do tempo. Portanto, a corrente do feixe do anel central do sincrotrão é monitorizada através da colecta de cada espectro. O registo constante da corrente do feixe no anel central permite a normalização à intensidade do fluxo.

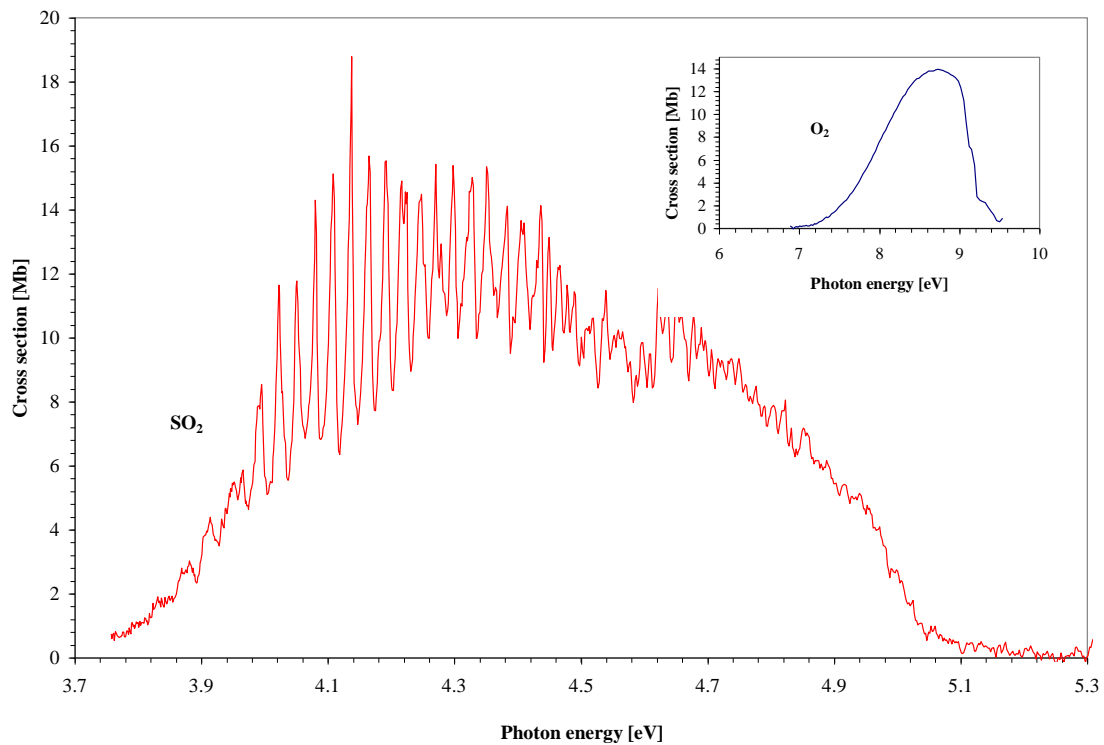


Ilustração 14. O espectro de foto-absorção de O<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub>.

#### 4.2.4 A análise de dados

A probabilidade de uma molécula absorver um fóton caracteriza-se por uma grandeza denominada de secção eficaz de foto-absorção. O espectro da secção eficaz de foto-absorção de uma molécula é dependente da energia e pode ser analisado através do uso da lei de atenuação de Beer-Lambert:

$$I_t(E) = I_o(E) \exp(-n \sigma(E) x) \quad (4.1)$$

$$\sigma(E) = \ln(I_o(E)/I_t(E)) / n x \quad (4.2)$$

Em que  $I_t(E)$  é a intensidade da radiação transmitida através da amostra de gás à energia  $E$ ,  $I_o(E)$  é a intensidade da radiação através da câmara evacuada à energia  $E$ ,  $n$  o número de densidade molecular do gás de amostra ( $pV = nRT$ ),  $\sigma(E)$  a secção eficaz de foto-absorção absoluta das moléculas à energia  $E$ , e  $x$  é o comprimento do percurso de absorção.

Para obter  $I_0$  em função do comprimento de onda da radiação UVV, fizeram-se várias medições com a câmara de foto-absorção sem a molécula de acetona. Posteriormente colocou-se uma quantidade de acetona líquida num balão onde previamente se fizeram vários ciclos de aquecimento e arrefecimento para purificar esta amostra. As medidas de foto-absorção foram novamente efectuadas com a amostra de acetona, tendo-se obtido valores de  $I_t$  em função dos mesmos comprimento de onda da radiação UVV para  $I_0$ . Com este conjunto de dados, foram obtidos valores absolutos da secção eficaz de foto-absorção,  $\sigma$ , para todas as regiões de interesse.



## 5 Discussão e Resultados

Na sequência do trabalho de investigação desta dissertação, estudou-se a espectroscopia de estados electrónicos da molécula de acetona,  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ . Neste trabalho são apresentados dados quantitativos extensivamente novos, de alta resolução da espectroscopia de estados electrónicos desta molécula. Contudo e dada a quantidade elevada de informação que foi possível obter desta análise, e da qual resultaram duas publicações em revistas de circulação internacional [13, 14] optou-se apenas por referir aqui os aspectos mais prementes dos estudos realizados relativamente ao método de detecção de compostos que possam servir de marcadores de uma dada patologia, com especial enfoque para os valores dos limites de detecção de compostos orgânicos voláteis, neste caso particular a acetona.

A determinação de concentrações, que mais abaixo indicamos a partir dos valores de limite de detecção, desta molécula no ar exalado pode dar informações quantitativas e qualitativas de presença deste composto bem como da sua interligação com a diabetes.

A amostra líquida usada nas medições de foto-absorção foi adquirida à Sigma-Aldrich, com uma pureza de 99,8%. As amostras foram sempre desgaseificadas por repetidos ciclos de aquecimento - arrefecimento (com  $\text{N}_2$  líquido).

A caracterização espectroscópica de estados electrónicos da acetona,  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ , foi investigada recorrendo à espectroscopia de foto-absorção UVV (ultra-violeta do vácuo) no intervalo de energias de 3,0-10,8 eV (Ilustração 15.). Em face da elevada resolução ( $\sim 0,075$  nm) foi possível obter uma análise detalhada das progressões vibracionais bem como propor pela primeira vez diversas estruturas de valência e de Rydberg [13, 14]. Uma vez que tal análise detalhada da estrutura electrónica está fora do âmbito desta dissertação, não faremos qualquer discussão nesse sentido. Centramo-nos apenas no método de detecção e de medida para obter valores de concentrações de acetona que possam servir de marcadores de patologia diabética. Da análise da Ilustração 15, assinalamos que o espectro de foto-absorção por radiação UVV da acetona apresenta basicamente quatro zonas distintas que podem ser consideradas para o estudo em análise. Assim, estas bandas de absorção localizam-se aproximadamente entre 4,0 – 5,5; 6,0 – 7,0; 7,5 – 8,5 e de 8,5 – 9,7 eV, sendo que este último limite corresponde ao valor da energia de ionização mais baixa deste

composto. Nesta conformidade, numa análise da acetona como marcador, qualquer destas zonas poderá ser utilizada, uma vez que se encontram bem caracterizadas, assim como são conhecidos com precisão ( $\pm 5\%$ ) os valores absolutos das suas secções eficazes de foto-absorção. Recorde-se que cada molécula apresenta um espectro característico e único de foto-absorção, o qual permite ser utilizado como “impressão digital” daquele composto.

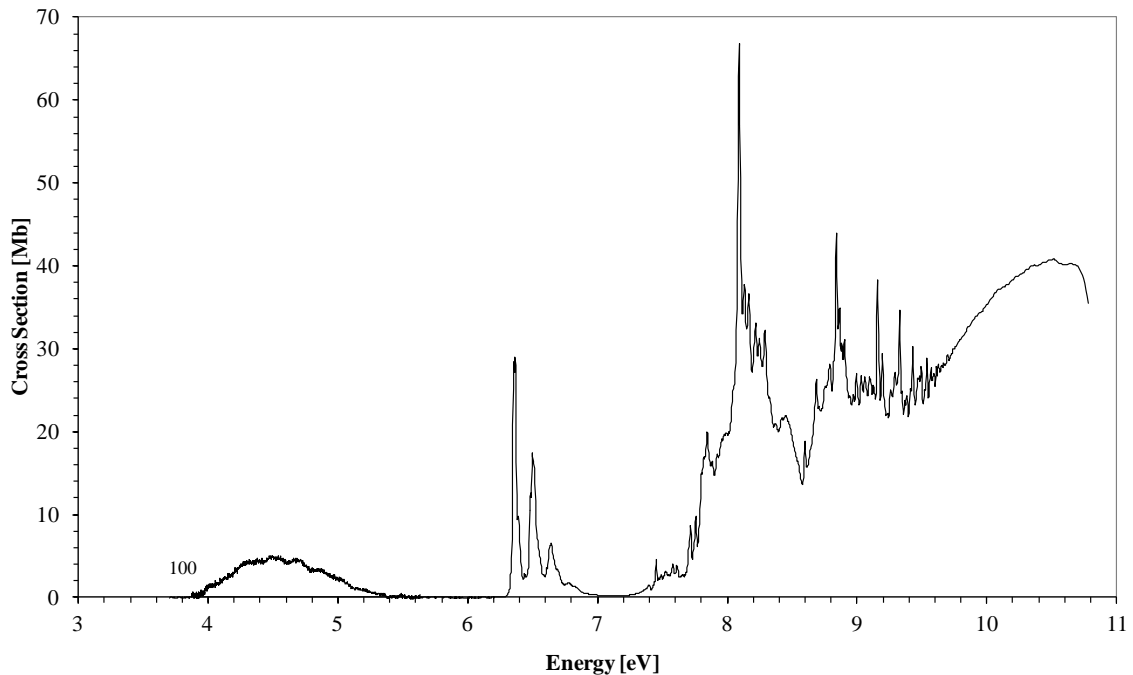


Ilustração 15. Espectro de foto-absorção de elevada resolução da acetona por radiação síncrotrão.

Na escala vertical 1 Mb corresponde a  $1 \times 10^{-20} \text{ m}^2$ .

Nas quatro bandas de absorção acima identificadas, os valores máximos de  $\sim 0,05$ ; 28,9; 66,8 e 43,9 Mb correspondem a energias dos fótons incidentes de 4,5; 6,4; 8,1; 8,8 eV, respectivamente. Assim, estas regiões podem ser utilizadas para avaliar concentrações de acetona de ar exalado, tal como descreveremos abaixo. É importante referir que na gama de energias de 8,5 – 9,7 eV, Huebner e colaboradores [15] relataram quatro mecanismos primários de dissociação importantes com especial atenção para aqueles que conduzem à produção de H,  $\text{CH}_2\text{CO} + \text{CH}_3$ , e  $\text{CO} + 2\text{CH}_3$ . Assim, qualquer tentativa de utilizar esta região do espectro de foto-absorção como marcador da acetona, poderá fornecer uma indicação única em face dos produtos dissociativos. Contudo, é importante salientar, que o limite superior (em energia) desta região do espectro de foto-absorção, 8,5 – 9,7 eV, corresponde ao valor mais baixo de

ionização da acetona (9,708 eV). Note-se que dos outros compostos presentes na mistura gasosa de ar exalado, o isopreno (relacionado com os níveis de colesterol) apresenta uma energia de ionização a cerca de 8,8 eV, que não mostramos aqui mas que se encontra bem documentado na referência [16], e um valor de secção eficaz de foto-absorção de ~40 Mb, que no caso da acetona ocorre a 9,7 eV e lhe corresponde um valor de ~44 Mb. Interessante observar que no caso do isopreno, este composto, apresenta valores típicos em indivíduos saudáveis de ppbv – pptv, pelo menos uma a duas ordens de grandeza abaixo da acetona (0,7 - 1,4 ppmv) [3], o que poderia não constituir qualquer limitação de que o isopreno pudesse nesta região de energia contribuir para mascarar o sinal proveniente da acetona. Uma vez que nas regiões dos estados (electrónicos) iónicos há uma densidade considerável de estados (pela contribuição do contínuo da ionização), é preferível escolher outras regiões do espectro a energias mais baixa onde não ocorram contribuições tão significativas. Tal procedimento de escolha de gamas de energia mais baixa é desejável pois permitirá numa mistura gasosa de ar exalado fazer uma distinção mais clara entre eles.

O limite de detecção de uma dada mistura gasosa pode ser calculado através da informação experimental do valor da secção eficaz de foto-absorção (vd. capítulo do dispositivo experimental, análise de dados, Lei de Beer-Lambert), o que se traduz no valor da densidade molecular ( $n_{min}$ ). Assim:

$$DL = n_{min} = \frac{A_{min}}{\sigma_{abs} \times l} \quad (5.1)$$

$$\sigma_{abs} = \frac{1}{l} \ln \frac{I_0}{I_t} \quad (5.2)$$

$$\frac{1}{[Mb] * [cm]} = \frac{1}{cm^3} \quad 1Mb = 10^6 * 10^{-24} cm^2 = 10^{-18} cm^2$$

onde  $A_{min}$  corresponde ao valor mínimo da absorvância (adimensional) e  $l$  é o percurso ou extensão da absorção, que no caso do presente trabalho corresponde a 25 cm (vd. capítulo do dispositivo experimental).

Discutimos agora as outras regiões do espectro de foto-absorção de UVV da acetona e os respectivos valores de detecção.

### 5.1 Região 7,5 – 8,5 eV

Nesta região a característica de foto-absorção da acetona apresenta a estrutura de maior intensidade com um valor de 66,8 Mb. Este máximo ocorre para uma energia de 8,1 eV e dada a sua secção eficaz tão significativa no contexto do espectro de UVV. Contudo, e genericamente falando, notamos que nesta região a característica de foto-absorção apresenta um conjunto de estruturas sobrepostas que dificultam a definição clara de um pico que possa ser utilizado como marcador (à excepção de 8,1 eV) bem como de uma contribuição do sinal de fundo que contribui, em média, em cerca de 20% da intensidade mais significativa. Este sinal resulta claramente da característica de foto-absorção da acetona e corresponderá a estados electrónicos dissociativos e não a um artefacto no processo de medida. Não obstante podermos determinar um valor para o limite de detecção que é para além das ppbv, pelas razões apontadas, não escolheríamos este intervalo de energias para determinação de contribuições de acetona.

### 5.2 Região 6,0 – 7,0 eV

Esta região de energia apresenta basicamente três características de fotoabsorção extremamente bem definidas e sem contribuição de outras estruturas e/ou sinal de fundo. O máximo local de 28,9 Mb a ~ 6,4 eV pode ser utilizado como um indicador de concentrações de acetona até um limite de detecção de 0,53 ppbv. Refira-se que nesta gama de energias, os processos de fotodissociação conduzem a estados electrónicos excitados da acetona,  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}^*$  que rapidamente podem dissociar em  $2\text{CH}_3 + \text{CO}$  com um rendimento quântico de 1,0 para a produção de CO a 6,7 eV. Tal produção de CO poderá mascarar o real valor da concentração deste gás (CO) em ar exalado se se pretender utilizar a técnica de foto-absorção por radiação sincrotrão para aferir da natureza de patologias associadas ao monóxido de carbono em especial em doentes que também apresentem níveis elevados de acetona.

### 5.3 Região 4,0 – 5,5 eV

Esta zona de energia do espectro de foto-absorção por radiação sincrotrão da acetona, apresenta os valores mais baixo de secção eficaz na gama do UVV. A estrutura que se observa na Ilustração 15 apresenta uma característica única e bastante alargada em termos do intervalo de energias em que se manifesta, i.e. tipicamente de 3,8 a 5,4 eV. Observamos assim um máximo de 0,05 Mb a 4,5 eV. Valores tão baixos na

secção eficaz de foto-absorção significam que os limites de detecção da acetona são da ordem de 0,87 ppmv.

## 6 Comparação dos limites de detecção dos níveis de acetona

Das diferentes gamas de valores para limites de detecção de acetona apresentados anteriormente, i.e. tipicamente de 0,53 ppbv – 0,87 ppmv, foi possível compará-los com os únicos dados disponíveis na literatura através de espectroscopia laser de cavidade ressonante CRDS (*Cavity RingDown Spectroscopy*) [17]. Recentemente, Sahay e colaboradores [18] realizaram medidas exaustivas de concentração de compostos orgânicos voláteis, nomeadamente acetona e isopreno, através de CRDS utilizando uma fonte de radiação UV de 266 nm ( $\sim 4,7$  eV) com uma potência por pulso de 1-3  $\mu$ J. Neste estudo, estes autores reportam um valor da secção eficaz de foto-absorção de comprimento de onda de 0,0045 Mb e os valores de detecção para a acetona variam de 0,24 ppmv a 1,33 ppmv. Numa análise comparativa com os resultados de presente trabalho com radiação sincrotrão a 4,5 eV, obtemos um valor de 0,05 Mb e uma detecção de 0,87 ppmv, verificando assim que a diferença dos nossos resultados para os de Sahay e colaboradores é de cerca de 4 vezes no limite de detecção. Contudo, a ordem de grandeza da nossa detecção está de acordo com aqueles autores, não obstante o valor da secção eficaz deles ser pelo menos uma ordem de grandeza abaixo da nossa. Tal poderá ser devido ao processo de calibração do dispositivo de CRDS para concentrações tão baixas, tal como referido na sua publicação [18].

Uma análise mais cuidada dos resultados apresentados nas secções anteriores, revelam a flexibilidade da técnica de radiação sincrotrão para aferir dos limites de detecção de VOCs noutras gamas de energia. Assim, a região de 6,0 – 7,0 eV apresenta a vantagem de podermos utilizar esta gama de energias para determinar concentrações de acetona mais baixas, cujo limite de detecção determinámos ser de 0,53 ppbv. De qualquer modo houve o cuidado de referir a desvantagem da utilização desta região (6,0 – 7,0 eV) em face dos mecanismos reaccionais que decorrem da decomposição da acetona maioritariamente na produção de CO. Parece claro que tal limitação apenas está dependente se o paciente em causa padecer de outra patologia ou apresentar níveis tão elevados de CO no ar exalado. Uma consulta ao *síte da internet* do Instituto Português da Qualidade relativamente à medição do monóxido de carbono (CO) no ar exalado [19], revela que as concentrações típicas deste gás (relacionado com a carboxi-hemoglobina presente no sangue), podem ser utilizadas como um forte indicador da exposição ao monóxido de carbono, permitindo assim

avaliar se houve inalação de fumo de tabaco nas últimas hora. O valores típicos variam de  $< 6$  ppmv para não fumadores, passando por 6 a 10 ppmv para fumadores ligeiros até 10 a 20 ppmv para fumadores. Contudo estes valores, carecem sempre de validade médica como indicadores directos de patologia que estão dependentes de diversos factores como o sexo, a idade, hábitos alimentares e outros, bem como outras patologias.

No que diz respeito às outras regiões, apresentámos os valores típicos e as limitações e/ou desvantagens nessa gamas de energia. Lamentavelmente não dispomos de quaisquer dados na literatura com que possamos comparar estes valores. Assim, em suma, e dadas as limitações apresentadas nas diversas gamas de energia, parece-nos que é desejável recomendar a região de 4,0 a 5,5 eV como a mais adequada para ser utilizada como marcador de níveis de acetona em ar exalado.

## 7 Conclusões

O objectivo deste estudo foi explorar o espectro de foto-absorção de um conhecido biomarcador da respiração, a acetona (2- propanona) que está relacionada com concentrações de glicose no sangue, numa vasta gama de energias (3,0 – 10,8 eV) e em especial comparar os valores da sua secção eficaz em torno de 266 nm (~ 4,7 eV) com os que se encontram disponíveis na literatura. A partir destes valores foi possível determinar experimentalmente os limites de detecção para este composto.

A concentração de acetona em ar exalado de pacientes saudáveis varia tipicamente de 0,1 – 2,7 ppmv [20]. O valor da secção eficaz de foto-absorção a 266 nm (~ 4,7 eV) utilizado por Wang e Mbi [21] e recentemente por Sahay et colaboradores [18], tem permitido obter um limite de detecção de 0,24 ppmv. No entanto, como estes autores referiram, há várias limitações decorrentes do método de calibração dos seus aparelhos de CRDS neste comprimento de onda (266 nm), especialmente porque o limite de detecção é inferior à concentração média de acetona no ar exalado de indivíduos saudáveis. Neste trabalho, os valores de 0,53 ppbv – 0,87 ppmv foram determinados como limites de detecção da acetona por radiação UVV nas diferentes gamas de energia no espectro de foto-absorção de 3,0-10,8 eV. O limite inferior determinado permite uma aferição das concentrações de acetona em ar exalado com uma sensibilidade maior do que a proposta pelo método de CRDS.

Com os resultados apresentados neste estudo, ficou claro que não estamos limitados apenas a um único valor de energia para determinação da concentração de acetona em ar exalado de pacientes com patologia diabética, contudo, não podemos descurar as limitações que decorrem de utilizar as diversas regiões de energia onde até o valor da secção eficaz de foto-absorção é maior, tal como foi discutido anteriormente.

Por conseguinte, com a presente ampla gama de energia (3,7 – 10,8 eV) e a possibilidade de futuras unidades médicas em estreita ligação e proximidade com instalações de radiação sincrotrão, deverá ser possível a utilização de radiação UVV para rastrear concentrações de acetona em pacientes e aferir da correlação destas concentrações com a patologia diabética. Uma vez que a acetona é um marcador metabólico bastante importante em meio fisiológico (também na respiração humana) e conhecimento das suas concentrações ser de extrema relevância do ponto de vista do diagnóstico da diabetes, acreditamos que os dados apresentados nesta tese bem



como os métodos de detecção, possam ser utilizados como alternativa num procedimento de calibração para a comunidade clínica.

## 8 Trabalho futuro

Uma das aplicações imediatas dos resultados deste trabalho seria a de encontrar uma amostra de indivíduos saudáveis e com patologia diabética em diferentes estágios, i.e. com níveis diferentes de acetona e severidade da doença, e estudar de forma cuidadosa e exaustiva os resultados da caracterização espectroscópica do ar exalado. Uma amostra suficientemente elevada, com critérios bem definidos de agrupar esses indivíduos em diversas classes e tipologias, tais como sexo, idade, hábitos alimentares, localização geográfica da sua residência e outros, permitiria avaliar o grau de fiabilidade da técnica não invasiva de monitorização dos níveis de acetona (por radiação UVV) e sua correlação com a diabetes.

Tal como referido no capítulo 2, há uma variedade muito significativa de compostos orgânicos voláteis endógenos presentes no ar exalado que podem ser utilizados como marcadores de diversas patologias. Assim os próximos estudos poderiam incluir o isopreno, uma vez que para este composto há alguns dados disponíveis na literatura o que desta forma permitiria a comparação com os estudos de foto-absorção UVV por radiação sincrotrão. Outros elementos que também despertaram a nossa curiosidade são os compostos que contêm enxofre (e.g.  $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ ), muito relacionados com a disfunção hepática, hidrocarbonetos metilados associados a neoplasia do pulmão e mama e compostos contendo azoto (e.g. amoníaco,  $\text{NH}_3$ ) relacionados com disfunção renal e uremia.

## Referencias

- [1] Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal (2005). *Como Usar a Insulina*. Lisboa: Lidel – edições técnicas, Lda
- [2] Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal (2001). *Viver com a Diabetes*. Lisboa: Climepsi Editores
- [3] Boguslaw Buszewski, Martyna Kesy, Tomasz Ligor, Anton Amann, *Biomedical Chromatography*, 2007, **21**, 553-566.
- [4] V Savarino, S Vigneri, G Celle, *Gut*, 1999, **45**(Suppl 1), I18–I22.
- [5] Cristina Lopes, João Fonseca, José Pedro Moreira da Silva, Maria da Graça Castel-Branco, *RevPortImunoalergologia*, 2005, **13** (1), 7 - 17
- [6] David L. Nelson, Michel M (2002). *Lehninger Princípios da Bioquímica*. Cox. 3 edição
- [7] <http://unifenasresumida.blogspot.pt/2012/03/corpos-cetonicos1.html#!/2012/03/corpos-cetonicos-1.html>
- [8] M Phillips, J Greenberg, J Awad, *F Clin Pathol*, 1994, **47**, 1052 - 1053
- [9] M E O'Hara, S O' Hehir, S Green, C A Mayhew, *Physiological Measurement*, 2008, **29**, 309-330, DOI: 10.1088/0967-3334/29/3/003
- [10] K Watanabe, *Adv. Geophysics*, 1958, **5**, 153.
- [11] D E Freeman, K Yoshino, J R Esmond and W H Parkinson, *Planet. Space Sci.*, 1984, **32**, 1125.
- [12] A C Vandaele, P C Simon, J M Guilmoit, M Carleer and R Colin, *J. Geo. Res.*, 1994, **99**, 25599.
- [13] Nobre M, Fernandes A, Ferreira da Silva F, Antunes R, Almeida D, Kokhan V, Hofmann S V, Mason N J, Eden S, Limão-Vieira P, *Phys Chem Chem Phys*, 2008, DOI: 10.1039/b708580j.

- [14] F Ferreira da Silva, M Nobre, A Fernandes, R Antunes, D Almeida, G Garcia, N J Mason, P Limão-Vieira, *Journal of Physics*, 2008, DOI:10.1088/1742-6596/101/1/012011
- [15] R. H. Huebner, R. J. Cellota, S. R. Mielczarek and C. E. Kuyatt, *J. Chem. Phys.*, 1973, **59**, 5434–5443.
- [16] G. Martins, A. M. Ferreira-Rodrigues, F. N. Rodrigues, G. G. B. de Souza, N. J. Mason, S. Eden, D Duflot, J. P. Flament, S. V. Hoffmann, J. Delwiche, M. J. Hubin-Franskin, P. Limão-Vieira, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, **11**, 11219-11231
- [17] C. Wang, G. P. Miller, C. B. Winstead, *Cavity ringdown laser spectroscopy*, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R. A. Meyers, Ed., New York, John Wiley, 2008
- [18] P. Sahay, S. T. Scherrer, C. Wang, *Sensors*, 2013, **13**, 8170-8187
- [19] [http://www.ipq.pt/backFiles/diaMetrologia\\_exp5.pdf](http://www.ipq.pt/backFiles/diaMetrologia_exp5.pdf)
- [20] M. Kinoyanma, H. Nitta, A. Watanabe, H. Ueda, *J. Health. Sci.*, 2008, **54**, 471-477
- [21] C. Wang, A. Mbi, *Meas. Sci. Technol.*, 2007, **18**, 2731-2741

## Anexos

Nobre M, Fernandes A, Ferreira da Silva F, Antunes R, Almeida D, Kokhan V, Hofmann S V, Mason N J, Eden S, Limão-Vieira P, *Phys Chem Chem Phys*, 2008, DOI: 10.1039/b708580j.



Acetona

F Ferreira da Silva, M Nobre, A Fernandes, R Antunes, D Almeida, G Garcia, N J Mason, P Limão-Vieira, *Journal of Physics*, 2008, DOI:10.1088/1742 6596/101/1/012011



Acetona\_Diabetes